Untersuchungen über in vivo induziertes Kaninchen – Interferon

INAUGURALDISSERTATION

zur Erlangung der Doktorwürde der

HOHEN MEDIZINISCHEN FAKULTÄT

DER UNIVERSITÄT DES SAARLANDES

vorgelegt von

Nikolaus Josef Brill

Saarbrücken

1974

Aus dem Institut für Hygiene und Mikrobiologie
der Universität des Saarlandes
Direktor: Prof. Dr.med., Dr.phil. W. Zimmermann

Untersuchungen über in vivo induziertes Kaninchen - Interferon

I N A U G U R A L D I S S E R T A T I O N
zur Erlangung der Doktorwürde
der
HOHEN MEDIZINISCHEN FAKULTÄT
DER UNIVERSITÄT DES SAARLANDES

1974

vorgelegt von
Nikolaus Josef Brill
geb. am 21.2.1950 in St. Wendel

Dekan: Prof. Dr. med. G. A. Jutzler
Referenten: Prof. Dr. med. R. Wigand
Prof. Dr. med. I. Esser

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

Die mündliche Prüfung wurde am 31.10.1974 abgelegt.

Inhaltsverzeichnis

I. Einleitung 1
Fragestellung 3

II. Material und Methoden 4
1. Viren 4
2. Kaninchennierenkulturen 5
3. Lösungen 5
4. Tiere 5
5. Interferoninduktion 5
6. Gewinnung von Seruminterferon 6
7. Bestimmung des Interferontiters 6
8. Hitzestabilität 6
9. Harnstoff-, Guanidin- und Mercaptoäthanol-behandlung 6
10. Hämagglutinationstitration und Hämagglutinationshemmungstest 7

III. Ergebnisse 8

1. Zeitliche und quantitative Verhältnisse bei der Interferoninduktion im Kaninchen durch Newcastle Disease Virus (NDV) 8

a) Kinetik des Interferons im Blut nach der NDV-Injektion 8

b) Abhängigkeit des Seruminterferontiters von der injizierten NDV-Dosis 9

2. Verhalten von Seruminterferon nach Lagerung 9

a) Einfluß der Lagerung bei 4° C auf den Interferontiter im Kaninchenserum . . . 10

b) Einfluß der Lagerung bei -20° C auf den Interferontiter im Kaninchenserum . . . 11

c) Zeitbedingte Titerschwankung bei Lagerung bei -20° C 12

3. Einfluß von Hitze, Harnstoff, Guanidin und 2-Mercaptoäthanol auf das Seruminterferon von Kaninchen 13

4. Immunstimulation der Interferonbildung . . . 14

a) Verlauf des Antikörpertiters im Kaninchenserum 14

b) Abhängigkeit der Immunstimulation von der injizierten Dosis 15

IV. Diskussion 17

V. Zusammenfassung 20

VI. Literaturverzeichnis 21

I. Einleitung

Neben der Bildung von Antikörpern kann sich der Organismus auch auf eine andere Art gegen Virusinfektionen schützen. Hoskins (28) entdeckte, daß sich nahe verwandte Viren bei ihrer Vermehrung in demselben Wirt gegenseitig hemmen, eine Reaktion, die nicht immunologisch bedingt ist, wie Findlay und Mc Callum (13) zeigten. Dies führte zum Begriff der "Viral Interference". Isaacs und Lindenmann (29, 30) zeigten schließlich, daß diese auf einem Stoff beruht, der in der Zelle nach Induktion durch Viren gebildet wird: Sie nannten ihn Interferon. Die Interferoninduktion kann durch aktive, aber auch durch inaktivierte, nicht mehr vermehrungsfähige Viren erfolgen (23). Seit einiger Zeit wissen wir, daß auch andere Stoffe Interferon induzieren können (4, 5, 6, 22, 25, 48). Bisher ist sicher, daß zur Bildung von Interferon eine funktionsfähige zelluläre DNA, die Synthese einer messenger-RNA und eine intakte zelluläre Proteinsynthese vorhanden sein müssen. Man nimmt heute an, daß Interferon die Synthese virusspezifischer Proteine oder viraler Nukleinsäuren hemmt. Es konnte gezeigt werden, daß bei RNA- und DNA-Viren die Bildung der "frühen" virusspezifischen Proteine verhindert wird (40). Ob die Ablesung der m-RNA im Polysom gehemmt wird oder die Bildung der Polysomen selbst gestört wird, ist noch ungeklärt.

Interferone haben eine unspezifische antivirale Wirkung. Andererseits zeigen dabei nicht nur die Virusarten, sondern auch die verschiedenen Stammvarianten eine unterschiedliche Interferonempfindlichkeit; die Sensibilität ist außerdem von der Art der Wirtszelle abhängig (3, 16). Von der Spezies-Spezifität (24), die besagt, daß Interferone nur im homologen System ihre Wirkung voll entfalten, gibt es, soweit bisher bekannt, nur eine Ausnahme: Interferon der Affenspezies Macaca zeigt nicht nur keine Spezies-, sondern auch keine Genusspezifität (8).

Da Interferone Proteine sind, verursachen sie eine Antikörperbildung (15, 44) und werden durch proteolytische Enzyme zerstört (38, 42). Gegenüber Nucleasen und anderen Enzymen zeigen sie eine Resistenz (30, 39). Von Aceton, Äthanol und gesättigter Ammoniumsulfatlösung werden sie ausgefällt (38, 42, 50). Zentrifugieren bei 100 000 g bewirkt keine Sedimentation (29, 30). Die Ergebnisse einer Einwirkung von UV-Licht hängen vom Reinheitsgrad ab (38, 50). Gleiches gilt für wiederholtes Auftauen und Einfrieren (42, 50).

Frühere Untersuchungen haben gezeigt, daß Interferone Molekulargewichte von 40 000 bis ca. 100 000 haben (1, 18, 32, 34, 35, 37, 42). Außerdem zeigen sie verschiedene isoelektrische Punkte (20). Ferner besteht ein enger Zusammenhang zwischen Interferonausschüttung und Fieberreaktion (45).

Zu den Folgeerscheinungen einer wiederholten Interferoninduktion zählen das Toleranzphänomen (3, 7, 26, 27) und die Immunstimulation. Wie frühere Versuche zeigten, tritt nach einer Virusinfektion eine Toleranz in bezug auf die Interferonbildung nach einer zweiten Injektion auf, d. h. es findet für kürzere Zeit keine erneute Interferonbildung statt.

Eine Immunstimulation dagegen bedeutet einen Anstieg des Interferontiters nach einer vorausgegangenen Immunisierung und erneuter Stimulation mit dem gleichen Antigen. Ergebnisse dieser Art wurden von mehreren Autoren nach Versuchen mit Leukozyten immunisierter Mäuse (16, 46, 49) sowie mit menschlichen Leukozyten (17) beschrieben.

Fragestellung

I. Zunächst untersuchten wir die zeitlichen und quantitativen Verhältnisse bei der Interferoninduktion durch NDV.

II. Weil Titerschwankungen beim mehrfachen Einfrieren und Auftauen auftraten, sollte nachgeprüft werden, ob allein die Lagerungszeit ebenfalls eine Änderung des Interferontiters bedingt.

III. Nachdem die Proteinnatur von Interferon bekannt ist, sollte neben seiner Hitzestabilität der Einfluß von Reagenzien untersucht werden, die Proteine schonend aufspalten, nämlich von Harnstoff und Guanidin, die insbesondere Wasserstoffbrücken zerlegen, und von 2-Mercaptoäthanol, das Disulfidbindungen spaltet.

IV. Weil die Interferonbildung möglicherweise von immunkompetenten Zellen abhängt, sollte weiterhin untersucht werden, ob wiederholte NDV-Injektion in NDV-immunisierten Kaninchen einen Anstieg des Interferontiters bewirkt.

II. Material und Methoden

1. Viren

Virusarten: - Newcastle Disease Virus (NDV)
- Stamm Beaudette -

- Vesiculäres Stomatitis Virus (VSV)
- Stamm Indiana -

Virusherstellung:

Newcastle Disease Virus: NDV wurde mittels Allantoisbeimpfung gezüchtet. Dazu wurden 9 - 11 Tage alte vorbebrütete Eier ausgewählt und im Gebiet des Luftsackes 0,1 ml des Inokulums verimpft. Nach Verschluß der Impfstelle mit Paraffin wurden die Eier weitere 2 Tage im Brutschrank bebrütet. Um eine Blutung zu verhindern, wurden sie vor der Virusentnahme über Nacht im Kühlschrank aufbewahrt. Dann wurden die Eischale über der Luftblase entfernt, die Membranen eröffnet und die Flüssigkeit abgesaugt. Nach einer Sterilitätsprüfung auf Blutagarplatten wurden die Allantoisflüssigkeiten zusammengegeben und der Hämagglutinationstiter bestimmt. Das Virus wurde dann in kleine Portionen abgefüllt und bei - 70° C eingefroren.

Vesiculäres Stomatitis Virus: VSV wurde in Hühnerfibroblastenkulturen in Roux-Flaschen gezüchtet. Am Tag des maximalen cytopathogenen Effekts wurde die Kulturflüssigkeit geerntet und 10 Minuten lang bei 3 000 rpm zentrifugiert. Der Überstand enthielt das VSV. Zur Bestimmung der ID_{50} wurde eine Verdünnungsreihe auf Kaninchennierenkulturen verimpft und austitriert. Das VSV wurde dann bei -70° C aufbewahrt.

2. Kaninchennierenkulturen (KN)

Die Nieren von ca. 2-3 Wochen alten Kaninchen wurden steril entnommen und so lange fraktioniert, bis das Gewebe vollständig auftrypsiniert war. Die Zellen wurden dann in so viel Eagle-Medium suspendiert, daß die Zellzahl ca. 500000 pro ml beträgt. Die Kulturen wurden dann in Roux-Flaschen 4-5 Tage lang bei 37° C bebrütet, bis sie zu einem Zellrasen zusammengewachsen waren. Von den Primärkulturen wurden dann in üblicher Weise Sekundärkulturen angelegt.

3. Lösungen

Nährlösungen:
Erhaltungslösung: Als Erhaltungslösung diente Eagle'sches Minimalmedium (MEM) mit einem Zusatz von 100 E/ml Penicillin und 100 E/ml Streptomycin.

Wachstumsmedium: Als Wachstumsmedium wurde Eagle'sches Minimalmedium mit einem Zusatz von 10% inaktiviertem Kälberserum verwandt.

Trypsinlösung: Trypsin-Difco 1:250 0,25% in Phosphatpufferlösung pH 7,4.

4. Tiere

Für die Versuche wurden Kaninchen mit einem Gewicht zwischen 2 und 3,5 kg verwandt. Die Tiere stammten, soweit möglich, für jeden Versuch immer aus dem gleichen Wurf.

5. Interferoninduktion

Die Interferoninduktion erfolgte durch i.v. Injektion in die Ohrvene der Kaninchen. Zur Injektion wurde NDV in steriler Tris-Pufferlösung vom pH 7,2 verdünnt, nachdem vorher die Virussuspension 10 min. bei 4000 rpm zentrifugiert worden war.

6. Gewinnung von Seruminterferon

Die Kaninchenohren wurden mit Alkohol desinfiziert und die Randvene mit einem Skalpell eröffnet. Das Blut wurde in Zentrifugenröhrchen gesammelt und nach Gerinnung 20 Minuten bei 4000 rpm zentrifugiert. Von dem Serum wurde dann der Interferontiter bestimmt.

7. Bestimmung des Interferontiters

Der Interferontiter wurde mit Hilfe der antiviralen Aktivität des Interferons bestimmt. Das Kaninchenserum wurde mit Eagle'schem Nährmedium schrittweise um den Faktor 2 verdünnt und in Volumina von je 1 ml auf je 2 KN-Röhrchen gegeben. Nach 24 h bei 37° C wurden die Flüssigkeit abgesaugt und die Röhrchen mit VSV (100 ID_{50}) infiziert. Als Interferontiter wurde die höchste Verdünnungsstufe der Serumverdünnung bezeichnet, bei der die Kultur nach 48 Stunden gerade einen 50 %igen CPE des VSV zeigte.

Kontrollröhrchen enthielten kein Kaninchenserum und zeigten zur Zeit der Interferontiterbestimmung einen CPE von 100 %.

8. Hitzestabilität

Die Serumproben wurden bei einer Temperatur von 56° C im Wasserbad 30 Minuten lang erhitzt und nach dem Abkühlen sofort auf ihren Interferongehalt titriert.

9. Harnstoff-, Guanidin- und Mercaptoäthanolbehandlung

Die Serumproben wurden 1:10 vorverdünnt und dann 1 ml Serum bei 4° C mit je 1 ml Lösung versetzt:

Harnstoff	4 M
Guanidin	1 M
2-Mercaptoäthanol	1 M

Nach 24 h bei 4° C wurden die Proben in vorher ausgekochten Dialyseschläuchen 48 h gegen 0,9 %ige NaCl-Lösung dialysiert. Die NaCl-Lösung wurde 4mal gewechselt. Anschließend wurde der Interferontiter bestimmt.

10. Hämagglutinationstitration (HA) und Hämagglutinationshemmungstest (HAH)

NDV besitzt die Fähigkeit, Menschenerythrozyten zu agglutinieren. Diese Reaktion läßt sich durch Antikörper enthaltende Seren hemmen. Um den Hämagglutinationshemmtest durchzuführen, wurden Menschenerythrozyten, Immunseren und Virusantigen benötigt.

Menschenerythrozyten: Für die Titration wurde eine 2%-ige Blutkörperchensuspension hergestellt.

Immunseren: Um unspezifische Inhibitoren gegen NDV zu inaktivieren, wurden die Serumproben 30 Minuten im Wasserbad auf 56° C erhitzt.

Virusantigen: Es wurde NDV verwandt, das vorher im Hämagglutinationstest (HA) austitriert wurde.

Hämagglutinationstest:
Bei dem Hämagluttinationstest wird die Virusverdünnung einer Suspension durch Titrieren festgestellt, wobei die Viren an der Oberfläche der Erythrozyten absorbiert und dabei die Erythrozyten agglutiniert werden. Endpunkt der Titration ist die Virusverdünnung mit dem Sedimentationsbild 1, welche eine Hämagglutinationseinheit (HE) enthält.
(0=freie Sedimentation bis 4=vollständige Agglutination)

Hämagglutinationshemmungstest:
Bei dem Hämagglutinationshemmungstest verhindern gegen die Viren gerichtete spezifische Antikörper die Hämagglutination. Dabei wurden je 0,2 ml Serum 0,2 ml Antigen, das entspricht 8 HE, zugesetzt, bevor 15 Minuten später 0,2 ml 2%ige Menschenerythrozytensuspension dazugegeben wurden. Abgelesen wurde nach 60 Minuten. Bei allen Versuchen liefen eine Serumkontrolle (ohne Virus) und eine Viruskontrolle (ohne Serum) mit.

III. Ergebnisse

1. Zeitliche und quantitative Verhältnisse bei der Interferoninduktion im Kaninchen durch NDV

a) Kinetik des Interferons im Blut nach der NDV-Injektion

Zum Nachweis des zeitlichen Auftretens von Interferon wurde den Tieren 500 HE NDV/kg Körpergewicht injiziert. Blut zur Interferontitration wurde vor sowie 1, 2, 4, 6, 10 und 24 Stunden nach der NDV-Injektion entnommen und anschließend der Interferontiter bestimmt.

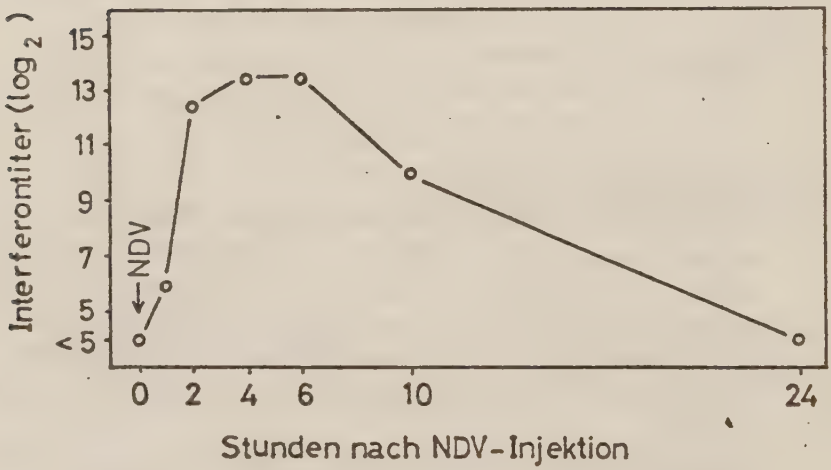

Abb. 1: Kinetik des Auftretens von Interferon im Blut nach NDV-Injektion

Abbildung 1 zeigt, daß schon 1 h nach der Injektion Interferon im Blut nachweisbar war. Der maximale Titer liegt zwischen 4 h und 6 h post infektionem (p.i.); danach fällt der Titer langsam ab. Nach 24 h war kein Interferon mehr nachweisbar.

b) Abhängigkeit des Seruminterferontiters von der injizierten NDV-Dosis

Gruppen von Kaninchen wurde NDV in verschiedenen Dosen injiziert. Nach 4 h wurde Blut zur Interferontitration entnommen und innerhalb 24 h titriert.

NDV-Dosis HE/kg	Interferontiter	induzierte Interferonmenge pro HE, pro kg KG
1 000	40 000	40
100	4 000	40
10	512	50
1	128	128
0,1	24	240

Tab. 1: Abhängigkeit des Seruminterferontiters von der injizierten NDV-Dosis

Aus Tabelle 1 geht hervor, daß die Höhe des Interferontiters zwar von der Höhe der Dosis abhängig ist, daß aber die Zunahme der Interferonproduktion nicht völlig proportional der Zunahme der injizierten NDV-Dosis erfolgt. Je kleiner die injizierte NDV-Dosis, umso größer ist nämlich die pro Einheit induzierte Interferonmenge. Bei hohen Dosen ist jedoch kein Unterschied mehr in der pro Einheit induzierten Interferonmenge festzustellen.

2. Verhalten von Seruminterferon nach Lagerung

Um einen Einfluß der Lagerung auf den Interferontiter festzustellen, wurde das Seruminterferon in Portionen steril abgefüllt und in Abständen von 1, 3 und 5 Wochen titriert.

a) Einfluß der Lagerung bei 4° C auf den Interferontiter im Kaninchenserum

Tier Nr.	Injizierte NDV-Menge (HE/kg KG)	Blut-entnahme h p.i.	4°C, 24 Std.- Interferon-titer	4° C, 5 Wochen Interfe-rontiter	Titer-anstieg
1			8 000	96 000	12 x
2			12 000	256 ooo	21 x
3	5	4	12 000	24 000	2 x
4			6 000	12 000	2 x
5			8 000	48 000	6 x
6			3 000	256 000	85 x
1			3 000	96 000	32 x
2			8 000	192 000	24 x
3	5	6	6 000	32 000	5 x
4			3 000	16 000	5 x
5			2 000	96 000	48 x

Tab.2: Titration 24 h nach der Blutentnahme und nach 5 Wochen

Aus Tabelle 2 ist zu ersehen, daß bei einer Lagerung bei 4° C über 5 Wochen der Seruminterferontiter um das 2 - 85fache ansteigt. Ein Unterschied zwischen 4 und 6 Stunden Interferon ist nicht festzustellen.

b) Einfluß der Lagerung bei -20° C auf den Seruminterferontiter von Kaninchen

Tier Nr.	Injizierte NDV-Menge (HE/kg KG)	Blut-entnahme h p.i.	4°C, 24 Std.-Interferon-titer	-20° C, 5 Wochen Interfe-rontiter	Titer-anstieg
1			8 000	24 000	3 x
2			12 000	96 000	8 x
3	5	4	12 000	32 000	2,5 x
4			4 000	48 000	12 x
5			8 000	24 000	3 x
6			4 000	96 000	24 x
1			3 000	24 000	8 x
2			8 000	48 000	6 x
3	5	6	1 000	3 000	3 x
4			2 000	24 000	12 x
5			2 000	10 000	5 x
7	50	4	8 000	240 000	30 x
7	50	6	20 000	240 000	12 x

Tab. 3: Titration 24 h nach Blutentnahme und nach 5 Wochen

Tabelle 3 zeigt ebenfalls einen Anstieg des Interferontiters im Verlauf von 5 Wochen. Auch hier besteht kein Unterschied zwischen 4 und 6 Stunden Interferon. Die injizierte Virusmenge zeigt ebenfalls keinen Einfluß.

c) Zeitbedingte Titerschwankung bei Lagerung bei -20° C

In den vorausgegangenen Versuchen haben wir festgestellt, daß nach 5 Wochen Lagerung der Interferontiter angestiegen war. Um zu testen, ob dieser Anstieg zeitabhängig ist, haben wir Serumproben im Abstand von 1, 3 und 5 Wochen titriert.

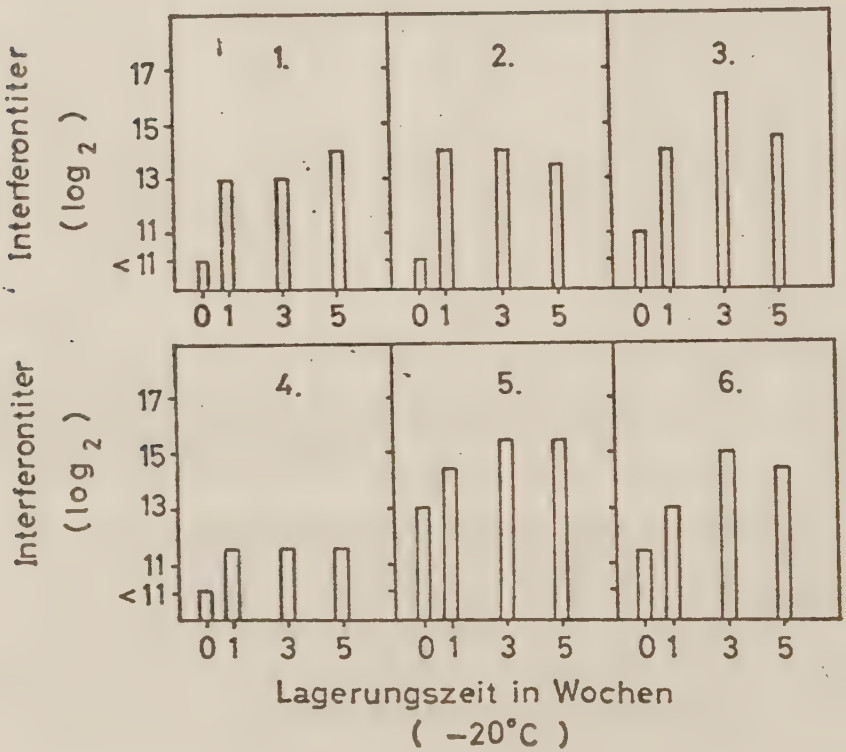

Abb. 3: Interferontiter nach Lagerung

Wie aus Abbildung 3 ersichtlich, zeigte sich dabei bei den meisten Tieren schon innerhalb einer Woche ein starker Anstieg des Seruminterferontiters.

Ein weiterer Anstieg von der 1. zur 3. Woche ist bei 3 Serumproben festzustellen, während dann von der 3. bis zur 5. Woche der Titer bei 3 Proben gleich blieb bzw. weiter anstieg, bei 3 anderen dagegen wieder leicht abfiel. Trotzdem blieb auch hier der Titer weit über dem 24 h-Wert bzw. dem Titer nach 1 Woche Lagerungszeit.

3. Einfluß von Hitze, Harnstoff, Guanidin und 2-Mercaptoäthanol auf das Seruminterferon von Kaninchen

Zur Untersuchung der physikalisch-chemischen Eigenschaften von Interferon wurde das Seruminterferon mit Guanidin, Harnstoff und 2-Mercaptoäthanol behandelt und der Einwirkung von Hitze ausgesetzt.

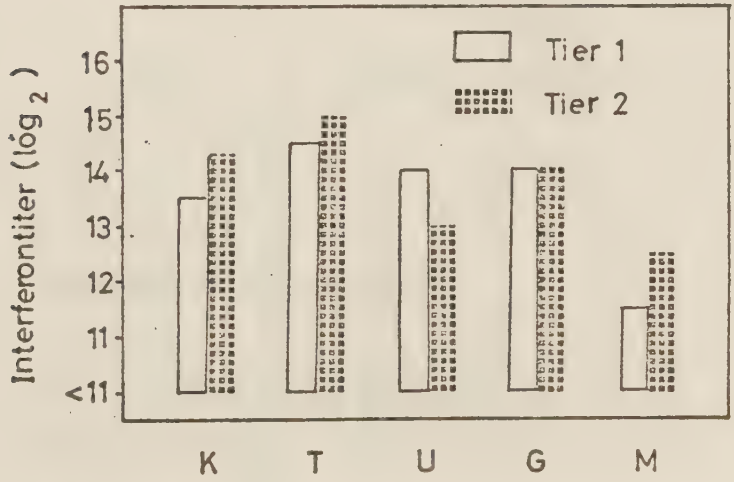

Abb. 2: Einfluß von Temperatur (56° C), Harnstoff, Guanidin und 2-Mercaptoäthanol auf Seruminterferon

K = Kontrolle U = Harnstoff M = 2-Mercaptoäthanol
T = Temperatur G = Guanidin

Aus Abbildung 2 ist zu ersehen, daß mit Ausnahme von 2-Mercaptoäthanol kein deutlicher Titerunterschied festzustellen ist. Bei den anderen Behandlungen liegen die Werte innerhalb der Fehlergrenzen der Kontrollwerte. Nach der Behandlung mit 2-Mercaptoäthanol ist dagegen ein Titerabfall um das 3 - 4fache festzustellen.

4. Immunstimulation der Interferonbildung

a) Um einen günstigen Zeitpunkt für eine 2. NDV-Injektion festzustellen, haben wir zunächst den Verlauf des Antikörpertiters im Serum bestimmt.

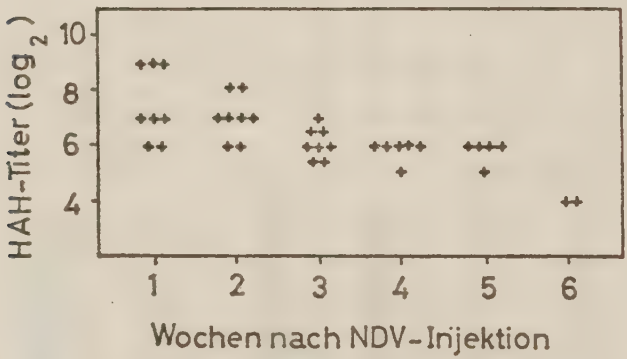

Abb. 4: Verlauf des Antikörpertiters im Serum
8 Tiere über 6 Wochen
davon verstorben: 2 Tiere nach 3 Wochen
4 " " 4 "
6 " " 5 "

Wie aus Abbildung 4 zu ersehen ist, ist innerhalb 1 - 2 Wochen im Blut ein hoher Antikörperspiegel vorhanden, der im Verlauf von 6 Wochen langsam abfällt.

b) Abhängigkeit der Immunstimulation von der injizierten Dosis

Kaninchen erhielten unterschiedlich hohe Dosen von NDV - 6 Stunden nach der 1. Injektion wurde Blut zur Interferontitration entnommen - 24 Stunden nach der Injektion wurden die Tiere dann mit einer Dosis von 200 HE/kg KG inokuliert, um die Unterschiede zwischen den einzelnen Dosen zu nivellieren. Die 3. Injektion in den jeweils der 1. Injektion entsprechenden Dosen erhielten die Tiere 5 Wochen nach der Immunisierung. 6 Stunden nach der 3. Injektion wurde dann nochmals Blut zur Interferonbestimmung entnommen.

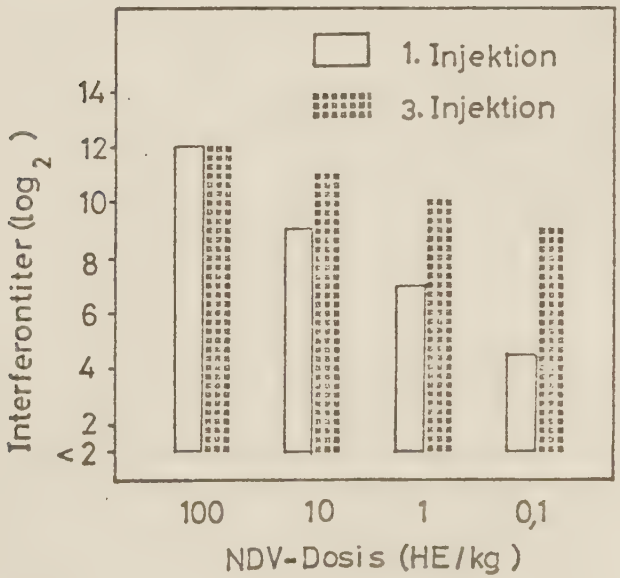

Abb. 5: Abhängigkeit der Immunstimulation der Interferonbildung von der injizierten Dosis

Wie Abbildung 5 zeigt, war bei den kleinen Dosen eine in bezug auf die 1. Injektion deutlich gesteigerte Interferonbildung festzustellen. Bei der Dosis von 100 HE NDV/kg KG war der Interferontiter dagegen genau so hoch wie bei der 1. Injektion. Mit Abnahme der Injektionsdosis nahm, wie Abbildung 5 zeigt, der Interferontiter nach der 3. Injektion gegenüber dem der 1. Injektion in erhöhtem Maße zu.

IV. Diskussion

Es wurde gezeigt, daß Interferon im Blut schon kurz nach Eindringen des Virus freigesetzt wird. Der höchste Seruminterferontiter wird 4 - 6 h nach der Injektion erreicht. Dann fällt der Titer allmählich ab. Dies deckt sich mit Befunden aus früheren Untersuchungen, die jeweils über eine zeitabhängige Interferonfreisetzung berichten (5, 7, 11, 12, 16). Je nach Induktor war der Kurvenverlauf dabei verzögert oder vorgezogen. Ebenso zeigten sich Unterschiede, je nachdem, ob die Versuche in vivo oder in vitro unternommen und welche Zellkultur bzw. welche Tierart benutzt wurden (5, 9, 11, 19, 39). Entsprechend früheren Ergebnissen (2, 45) ist auch in unseren Versuchen die absolut freigesetzte Interferonmenge von der injizierten Induktordosis abhängig. Dabei ist die pro HE freigesetzte Menge an Interferon nur bei hohen Induktordosen konstant und nimmt bei niederen zu (siehe Tabelle 1). Dies könnte man so erklären, daß bei niederen Dosen ein Induktormolekül von einer Zelle aufgenommen wird, während bei hohen Dosen mehrere Induktormoleküle pro Zelle aufgenommen werden. Dabei können dann ausreichende Mengen von Interferon-Inhibitor gebildet werden, über den schon andere Autoren berichteten (10, 14, 21, 31, 33, 47).

Bisher wurde Interferon überwiegend auf seine Empfindlichkeit gegenüber proteinspaltenden Reagenzien (27, 36, 42) und Hitze (20, 32, 36, 42) sowie auf seine pH- und UV-Empfindlichkeit (34, 36, 38, 42, 50) untersucht. Unseres Wissens berichteten bisher nur Zemla und Vilček (50) sowie Merigan u.a. (42) über eine Sensibilität gegenüber vermehrtem Auftauen und Einfrieren. Ob allein schon eine längere Aufbewahrung einen Einfluß auf Interferon ausübt, ist, wie wir glauben, bisher noch nicht untersucht worden. Wie unsere Versuche gezeigt haben, bewirkte eine längere Aufbewahrung einen Anstieg des Interferontiters. Dies könnte man darauf zurückführen, daß ein Interferon-Inhibitor zerstört wird, der nach Berichten anderer Autoren eine große Ähn-

lichkeit mit Interferon besitzt. Andererseits lassen sich eine mit der Lagerungszeit zunehmende Inaktivierung des Interferons und ein Titerabfall nicht ausschließen.

Da der Lagerungsversuch zeigte, daß ein Interferon-Inhibitor vorhanden sein könnte, hofften wir, durch eine Behandlung des Serums mit verschiedenen physikochemischen Agentien das Interferon von dem Inhibitor zu trennen. Eine Titererhöhung wurde jedoch nach der Einwirkung von Hitze, Harnstoff, Guanidin oder 2-Mercaptoäthanol nicht beobachtet. Es ist daher anzunehmen, daß entweder kein Inhibitor im Blut vorhanden ist, oder daß eine Interferonkomponente gegenüber den physikochemischen Agentien ähnliche Empfindlichkeit zeigt wie der Inhibitor, so daß keine Titererhöhung festzustellen war. Auch ein Titerabfall des Seruminterferons nach der Behandlung mit Hitze und Harnstoff wurde nicht sicher festgestellt. Eine geringfügige Schwankung des Interferontiters liegt noch innerhalb der Fehlergrenzen. Es wurde in der Literatur über die unterschiedliche Empfindlichkeit des Interferons gegenüber Harnstoff, Guanidin- und Hitzeeinwirkung (20, 32, 34, 42) berichtet. Kadri und Kohlhage (31) haben gezeigt, daß der hochmolekulare Anteil des Seruminterferons Hitze-, Harnstoff- und Guanidin-Empfindlichkeit zeigt, während sich der niedermolekulare Anteil gegenüber den drei genannten Agentien resistent verhält. Da bei den Kaninchen nach NDV-Induktion im Durchschnitt 80% niedermolekulares Interferon gebildet wird (31), ist es daher wahrscheinlich, daß der hochmolekulare Anteil bei den Untersuchungen des ungereinigten Seruminterferons nicht ins Gewicht fällt. Was Guanidin betrifft, decken sich unsere Ergebnisse nicht mit denen anderer Untersucher (31), die über eine völlige Inaktivierung des hochmolekularen und eine 50 - 70%ige Inaktivierung des niedermolekularen Anteils berichten; dazu müßte ein stärkerer Titerabfall nachzuweisen sein. Im Gegensatz dazu scheint 2-Mercaptoäthanol auch den niedermolekularen Anteil zumindest teilweise zu inaktivieren, da eine deut-

liche Titersenkung festzustellen ist. In welchem Ausmaß hoch- und niedermolekularer Anteil im einzelnen betroffen sind, müßte eine Untersuchung an gereinigtem Interferon klären.

Mehrere Autoren berichteten bisher über das Toleranzphänomen bei Interferon (3, 7, 26, 27), das unabhängig von der Induktordosis in Erscheinung trat und etwa 13 Tage anhält. Deshalb gaben wir in unseren Versuchen die 3. Injektion 5 Wochen nach der 1. Injektion, zu einem Zeitpunkt, zu dem der Titer des virusspezifischen Antikörpers wieder sehr niedrig und auch das Toleranzstadium überschritten war. Dennoch konnten wir eine Steigerung des Interferontiters nur bei kleinen Induktordosen feststellen. Bei hohen Dosen wurde keine Steigerung erzielt. Vielmehr erreichte der Titer die gleiche Höhe wie bei der 1. Injektion. Es ist wahrscheinlich, daß die Titersteigerung bei kleinen Dosen auf einer immunologischen Gedächtnisleistung beruht. Daß bei den hohen Dosen keine Steigerung des Titers im Anschluß an die 3. Injektion erzielt wurde, liegt eventuell daran, daß schon bei kleinen Induktordosen eine maximale Antwort erfolgt.

V. Zusammenfassung

In der Arbeit wurde durch Newcastle Disease Virus (NDV) in vivo induziertes Kanincheninterferon untersucht. Dabei zeigte sich, daß der maximale Interferontiter 4 bis 6 Stunden nach der Infektion mit NDV auftrat und daß die Titerhöhe zwar dosisabhängig, aber nicht völlig proportional der injizierten Induktormenge ist. Unsere Versuche zeigen auch, daß der Seruminterferontiter bei längerer Lagerung unabhängig von der Lagertemperatur ansteigt, was eventuell auf die Inaktivierung eines Interferon-Inhibitors zurückzuführen ist. Eine Behandlung mit Hitze, Harnstoff und Guanidin ergab keine Änderung des Interferontiters. Dagegen ist bei Einwirkung von 2-Mercaptoäthanol ein Titerabfall festzustellen. Bei wiederholter Stimulation zeigte sich in unseren Versuchen nur bei kleinen Induktordosen eine Steigerung des Interferontiters, die wahrscheinlich auf einer immunologischen Gedächtnisleistung beruht.

VI. Literaturverzeichnis

1) Azuma, M., Yamada, M. and Nishioka, R. — Relationship between immunity and interferon production in macrophages II. Molecular weights of interferon produced in macrophage cultures Japan J. Microbil., 14, 319-323 (1970)

2) Baron, S. and Buckler, C.E. — Circulating interferon in mice after intravenous injection of virus Science 141, 1061-1063 (1963)

3) Bausek, G. and Merigan, T. — Two mechanisms of cell resistance to repeated stimulation of interferon Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 134, 672-676 (1970)

4) Borecký, L. and Lackovič, V. — The cellular background of interferon production in vivo Comparison of interferon induction by Newcastle disease virus with B. pertussis Acta virol. 11, 150-158 (1967)

5) Borecký, L. and Lackovič, V. — Partial heterologous tolerance to interferon production in mice infected with B. pertussis Acta virol. 10, 271-272 (1966)

6) Borecký, L., Lackovič, V. and Russ, G. — Interferon production in leucocytes and the antiviral protection of mice treated with endotoxin Ann. N.J. Acad. Sci. 173, 320-330 (1970)

7) Borden, E. C. and Murphy, F. — The interferon refractory state: in vivo and in vitro studies of its mechanism J. Immunology 106, 134-142 (1972)

8) Bucknall, R.A. — "Species-specifity" of interferons a misnomer? Nature (Lond.) 216,1022-1023 (1967)

9) Cantell, K. and Paucker, K. — Quantitative studies on viral interference in suspended L cells IV Production and assay of interferon Virology 21, 11-21 (1963)

10) Chany, E. and Robbe-Maridor, F. — Enhancing effect of the Murine Sarcoma Virus (MSV) on the replication of the Mouse Hepatitis Virus (MHV) in vitro Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 131, 30-35 (1969)

11) De clerq, E. and Merigan, T. — Current concepts of interferon induction Ann. Rev. Med. 17-38 (1970)

12) De Clerq, E. and Merigan, T. — Stimulation or inhibition of interferon production depending on time of cycloheximide administration Virology 42, 799-802 (1970)

13) Findlay, G.N. and Mc Callum, F.O. — An interference phenomenon in relation to yellow fever and other viruses J. Path. Bact. 44, 405-424 (1937)

14) Forthingham, T.E. — Enhancement of Sindbis Virus plaque size in cell cultures treated with Mumps Virus-infected egg fluid
Virology 19, 583-586 (1963)

15) Friedman, R. and Baron, S. — The role of antibody in recovery from infection with vaccinia virus
J. Immunol 87, 379-381 (1961)

16) Glasgow, L.A. — Leucocytes and interferon in the host response to viral infections

II Enhanced interferon response of leucocytes from immune animale
J. Bact. 91, 2185-2191 (1966)

17) Green, J.A., Cooperband, S.R., Kleinman, L.T. and Kibrick, S. — Immune stimulation of interferon in human leucocyte cultures by non-viral antigens
Ann. N.J. Acad. Sci. 173, 736-741 (1970)

18) Hallum, J.V., Youngner, J.S. and Merigan, T. — Molecular species of circulating interferon in mice infected with NDV
Virology 34, 802-804 (1968)

19) Hallum, J.V., Youngner, J.S. and Stinebring, W.R. — Interferon activity associated with high molecular weight proteins in the circulation of mice injected with endotoxin or bacteria
Virology 27, 429-431 (1965)

20) Hellmann, W.
Physiko-Chemisches Verhalten verschiedener durch Newcastle Disease Virus induzierter Kaninchen-Interferone
Dr.-Dissertation der Univ. Marburg/Lahn (1971)

21) Hermodsson, S.
Inhibition of interferon by an infection with Parainfluenza Virus Type 3 (PIV-3)
Virology 20, 333-343 (1963)

22) Ho, M.
Interferon-like viral inhibition in rabbits after intravenous administration of endotoxin
Science 146, 1472-1474 (1964)

23) Ho, M.
Animal viruses and interferon formation
3.12. Active and inactivated viruses as interferon inducers, in "Interferon and Interferon inducers"
(N.B. Finter, ed.) 42-43 (1973)
North Holland Publ. Co., Amsterdam, London, American Elsevier Publishing Co., Inc. New York

24) Ho, M. and Enders, J.F.
Further studies on the inhibitor of viral activity in infected cell cultures and its role in chronic viral infections
Virology 9, 446-447 (1959)

25) Ho, M. and Ke, Y.H.
The mechanism of stimulation of interferon production by a Complexed polyribonucleotide
Virology 40, 693-702 (1970)

26) Ho, M., Kono, Y. and Breinig, M.K. — Tolerance to the induction of interferons by endotoxin and virus: Role of a humoral factor Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 119, 1227-1232 (1965)

27) Ho, M. and Kono, Y. — Tolerance to the induction of interferons by endotoxin and virus J. clin, Invest. 44, 1059-1060 (1965)

28) Hoskins, M. — A protective action of neurotropic against viscerotropic yellow fever virus in Macavus rhesus Americ. J. trop. Med. Hyg. 15, 675-680 (1939)

29) Isaacs, A. and Lindenmann, J. — Virus interference I. The Interferon Proc. roy, Soc. B. 147, 258-267 (1957)

30) Isaacs, A., Lindenmann, J. and Valentine, R.C. — Virus interference II. Some properties of interferon Proc. roy, Soc. B. 147, 267-273 (1957)

31) Isaacs, A., Rotem, J. and Fantes, K.H. — An inhibitor of the production of interferon ("blocker") Virology 29, 248-254 (1966)

32) Kadri, A. and Kohlhage, H. — Physikalisch-chemische Eigenschaften Myxovirus induzierter Seruminterferone des Kaninchens Arch. Virus-Forsch. 28, 51-62 (1969)

33) Kato, N., Onta, F. and Okada, A. — Counteraction between interferon and enhancer. Virology 28, 785-788 (1966)

34) Ke, Y.H. and Ho, M. — Characterization of virus- and endotoxin- induced interferons obtained from the serum and urine of rabbits. J. of Virol, 1, 883-890 (1967)

35) Ke, Y.H., Mo, M. and Merigan, T. — Heterogenicity of rabbit serum interferons. Nature 211, 541-542 (1966)

36) Lampson, G.P., Tytell, A.A., Nemes, MM. and Hillemann, M.R. — Purification and characterization of chick embryo interferon. Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 112, 468-478 (1963)

37) Lampson, G.P., Tytell, A.A., Nemes, M.M. and Hillemann, M.R. — Multiple molecular species of interferons of mouse and rabbit origin. Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 121, 377-384 (1966)

38) Lindenmann, J., Burke, D. and Isaacs, A. — Studies on the production, mode of action and properties of interferon. Brit. J. Path. 38, 551-562 (1957)

39) Lockart, R.Z. jr. — Production of an interferon by L-cells infected with Western equine encephalomyelitis virus. J. Bact. 85, 556-566 (1963)

40) Marcuss, P. J. and Salb, J.M. — Molecular basis of interferon action: Inhibition of viral RNA translation Virology 30, 502-516 (1966)

41) Merigan, R.C. — Purified interferons: Physical properties and species specificity Science 145, 811-813 (1964)

42) Merigan, T., Winget, C.A. and Dixon, C.B. — Purification and characterization of vertebrate interferons J. molec. Biol. 13, 679-691 (1965)

43) Nagano, Y., Maehara, N. and Nakamura, W. — Role of circulating leukocytes in the production of virus-inhibiting factor or interferon Japan. J. Microbiol. 14, 209-213 (1970)

44) Pauker, K. and Cantell, K. — Neutralization of interferon by specific antibody Virology 18, 145-147 (1962)

45) Siegert, R., Shu, H.L. and Kohlhage, H. — Correlation between fever and interferon titer in rabbits after induction with myxoviruses Life Sci. 6, 615-620 (1967)

46) Stinebring, W.R. and Absher, M.P. — Production of interferon following an immune response Ann. N.Y. Acad. Sci. 173, 714-715 (1970)

47) Truden, J.L., Sigel, M.M. and Dietrich, L.S. — An interferon antagonist: Its effect on interferon action in Mengo-infected Ehrlich Ascites Tumor Cells Virology 33, 95-103 (1967)

48) Vilček, J., Ng, M.H., Friedmann-Kien, A.E. and Krawciw, T. — Induction of interferon synthesis by synthetic double stranded polynucleotides J. Virol. 2, 648-650 (1968)

49) Yamada, M., Azuma, M., Nishioka, R. and Togashi, T. — Relationship between immunity and interferon production in macrophages Japan. J. Microbiol. 14, 311-318 (1970)

50) Zemla, V. and Vilček, J. — Studies on an interferon from Tick- borne Encephalitis Virus- infected cells (JF) II Physical and Chemical Properties of IF Acta virol 5, 367-372 (1961)

Danksagung

Hiermit sage ich herzlichen Dank:

Herrn Prof. Dr. med. R. Wigand für die Gewährung eines Arbeitsplatzes,
Herrn Dr. med. H.L. Shu für die Überlassung des Themas und die freundliche Unterstützung bei der Durchführung der Arbeit,
Frau I. Maurer und Frl. D. Kuntze für die mir erwiesene technische Hilfe.

Die Arbeit wurde unterstützt von der Deutschen Forschungsgemeinschaft.

Lebenslauf

Am 21.2.1950 wurde ich als ältester Sohn des Polizeibeamten Theodor B r i l l und seiner Ehefrau Gertrud Brill geb. Kessler in St.Wendel geboren.

Nach dem Besuch der kath. Volksschule in Berschweiler vom Herbst 1956 bis Ostern 1960 besuchte ich ab 1960 das Staatliche Gymnasium in St.Wendel. Dort bestand ich 1968 das Abitur.

Seit dem Wintersemester 1968/69 bin ich in der medizinischen Fakultät der Universität des Saarlandes immatrikuliert. Das Vorphysikum habe ich am 5.8.1969 bestanden, das Physikum am 16.4.1972.

Das Staatsexamen habe ich am 7.8.1974 bestanden.